



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 40 28 487 A 1**

⑤① Int. Cl.⁵:
A 61 K 37/42
A 61 K 37/66
A 61 K 31/557
// C07K 15/06

②① Aktenzeichen: P 40 28 487.5
②② Anmeldetag: 9. 9. 90
④③ Offenlegungstag: 12. 3. 92

DE 40 28 487 A 1

⑦① Anmelder:
Wehling, Peter, Dr.med., 4019 Monheim, DE

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑤④ Entzündung- und schmerzhemmendes Nervenmittel

⑤⑦ Die Erfindung betrifft die Herstellung eines Medikamentes zur Gesundung von Nerven inkl. ihrer Rezeptoren, deren Funktion aufgrund entzündlicher Ereignisse im Nerven selbst oder in der Umgebung desselben gestört ist. Dabei kommt die Wirkung von Substanzen zum Einsatz, die auf einer Hemmung der Synthese der Zytokine oder der Blockade deren Rezeptoren oder auf Antikörpern gegen diese Zytokine beruht. Die Folge ist eine Hemmung der Entzündung und die Eindämmung des damit verbundenen Schmerzes.

DE 40 28 487 A 1

ten Substanzen ist bisher nicht bekannt.

Aus operationstechnischen und heilungstechnischen Gründen ist es weiter vorteilhaft, wenn das Medikament zusätzlich einen Fibrinkleber aus Aprotinin-CaCl₂; Thrombin und Fibrinogen; Tissucol® (Rote Liste 47 047) aufweist. Das Medikament kann auch zusätzliche Tenside, Lösungsmittel, Lösungsvermittler, Stabilisatoren, Antioxidantien, wie Dithioerythrit, aufweisen, um die Haltbarkeit und Wirkung der Zusammensetzung zu gewährleisten.

Die Applikationsform des Medikamentes ist dabei vorteilhafterweise dem Behandlungsverfahren angepaßt. Aufgrund der verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten erscheinen vor allem folgende Applikationsformen vorteilhaft: als Injektionslösung, als Infusionslösung für lokale und/oder systemische Infusionen, als therapeutisches System, z. B. als Dispenserimplantat, Dispenserkügelchen, als Lösung und Gelee zum Bestreichen oder als Zwischenfüllung.

Die vorteilhafte Wirkung des erfindungsgemäßen Medikaments ergeben sich aus verschiedenen Tierversuchen. Im folgenden werden Tierversuche dargestellt, die zeigen, daß Interleukininhibitoren spontane Nervenwurzelaktivität von zytokineschädigten Nerven während und nach Kompression verringern (Serie 1) und eine durch Zytokine bedingte Nervenfunktionsminderung abmildern (Serie 2).

Die Ergebnisse der Versuche sind in den Fig. 1–4 graphisch dargestellt. Es zeigt

Fig. 1 Die Höhe der Frequenz abgeleiteter EMG-Aktivität im m. gastrocnemius als Funktion der Zeit. Die Kompression der Nervenwurzel S1 rechts erfolgte in Experimental- und Kontrollgruppe vom Zeitpunkt $t = 0$ min – $t = 60$ min. Nach Dekompression kommt es zu einem deutlichen Fortbestehen der Aktivität trotz Dekompression in der Gruppe (schwarze Balken), die mit synovialen Zytokinen vorbehandelt wurde und kein IL-1 Inhibitor erhalten hatte. In der Gruppe, die neben den synovialen Zytokinen zuvor mit Inhibitor behandelt wurde, fällt eine signifikant niedrigere Impulsfrequenz auf (helle Balken). Die Balken entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichung von insgesamt 12 Ratten. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind ab dem Zeitpunkt $t = 60$ min signifikant.

Fig. 2 Die Rolle der Zytokine und IL-1 Inhibitoren bei der Entstehung und Heilung von Radikulopathien.

1. Patienten entwickeln erhöhte Spiegel von Entzündungsmediatoren wie IL-1 in den degenerierten kleinen Wirbelgelenken und der Bandscheibe.
2. Diese Mediatoren werden lokal durch die Synovialzellen der Fazetten und den Chondrozyten der Bandscheibe produziert.
3. Die Mediatoren durchqueren die Synovialmembran bzw. verlassen den Bandscheibenraum und diffundieren zur Nervenwurzel, zu den Nervenendigungen und Rezeptoren in der Nähe der kleinen Wirbelgelenke.
4. Diese Mediatoren bewirken eine Entzündung des Nerven, gefolgt von einer Funktionsverschlechterung und Destabilisierung der Nervenmembran.
5. Dieser Prozeß begünstigt die Entstehung spontaner Nervenwurzelaktivität.
6. IL-1 Inhibitoren blockieren die IL-1 Rezeptoren und verringern damit die Entstehung von entzündlichen Nervenveränderungen und spontaner Nervenwurzelaktivität.

Fig. 3 Die absolute Veränderung der L1 Latenz als Funktion der untersuchten Gruppe nach Injektion von synovialen Zytokinen ohne und mit vorheriger Verabreichung von IL-1 Inhibitor. Die Messungen wurden 4 Stunden nach Injektion des Inhibitors bzw. Kochsalz durchgeführt. Die Balken stellen die Mittelwerte mit Standardabweichung von jeweils 6 Tieren dar. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist signifikant ($p < 0,039$).

Fig. 4 Die Wirkung von IL-1 Inhibitor auf die Latenz der CMAP Latenz verglichen mit der Kontrollgruppe, die keinen Inhibitor erhielt. In beiden Gruppen wurden synoviale Zytokine injiziert. Man betrachtet die kürzere Latenz in der Gruppe, die mit Inhibitor vorbehandelt wurde. Der Unterschied ist signifikant ($p < 0,103$). Die Balken stellen Mittelwerte mit Standardabweichung dar.

SERIE 1 (IL-1 Inhibitor bei Nervenkompression)

Einleitung

Rückenschmerz in Verbindung mit radikulärer oder pseudoradikulärer Verteilung ist in seiner Pathophysiologie nur unvollständig verstanden.

Mixter und Barr stellten einen Zusammenhang zwischen Ischiasschmerz und Bandscheibenvorfall her (21). Die Ursache des Schmerzes wurde in spontaner druckbedingter Nervenwurzelaktivität im Bereich nozizeptiver Fasern gesehen. Experimentelle Untersuchungen von Adrian schienen diese Hypothese zu bestätigen (1). Allerdings wurde dieses Erklärungsmodell aufgrund unterschiedlicher klinischer und experimenteller Beobachtungen immer wieder angezweifelt.

Lindblom und Rexed postulierten das ganglion dorsale als Auslöser von Ischias (15). Diese Autoren beschrieben die Kompression des ganglion dorsale als eine Folge des Bandscheibenvorfalles. In einigen der beobachteten Fälle spielten vergrößerte Facetten ebenfalls eine Rolle.

1977 berichteten Howe et al. über die mechanische Sensitivität des ganglion dorsale (13). In diesen Experimenten wurde die dorsale Nervenwurzel bei der Katze bzw. der Suralnerv beim Kaninchen auf Spontanaktivität nach Kompression untersucht. Dabei zeigte sich, daß bei intakter Nervenfasern nur über Sekunden repetitive Aktionspotentiale beobachtet werden konnten. Wurde aber zur gleichen Zeit das Spinalganglion minimaler Kompression ausgesetzt, kam es zu lang andauernder Spontanaktivität. Auch chronisch vorgeschädigte Nervenfasern zeigten deutlich erhöhte mechanische Sensitivität. Dies war sowohl bei den schnell als auch langsam leitenden Fasern zu beobachten.

Wall und Devor beschrieben ebenfalls die Mechanosensitivität des ganglion dorsale bei der Ratte und vermuteten dieses Phänomen als Ursache für die Nozizeption und Schmerzentstehung vor allem in den Prozessen, bei denen Sensibilitätsverlust peripher mit Schmerz gekoppelt ist (25).

Sall et al (1989) zeigte in seinen Untersuchungen, daß beim Menschen Entzündungsmediatoren bei degenerativen Erkrankungen der Bandscheibe auftreten.

Ektople Impulsgeneration sind sowohl in der dorsalen als auch ventralen Nervenwurzel bei der Ratte experimentell nachweisbar (5, 6).

Bei all diesen Untersuchungen blieb unklar, welche Rolle entzündliche Veränderungen und ihre Hemmung für die Entwicklung von Spontanaktivität im Bereich

leukin und seinen Inhibitoren ist deswegen je nach vorliegender Situation heilend oder zerstörend.

In den hier dargestellten Untersuchungen wurde die Entzündung durch teilweise gereinigte Zytokinlösung der Synovialzelle HIG-82 ausgelöst. Solch eine Lösung hat gegenüber rekombiniertem Reinmaterial den Vorteil, daß es eine physiologisch und natürlich auftretende Substanz ist. Reinformen von Zytokinen treten dagegen unter physiologischen Verhältnissen kaum auf. Wie in anderen Untersuchungen gezeigt werden konnte, bewirken diese Zytokine eine erhöhte Synthese von Kollagenase, Gelatinase, Stromelysin und Prostaglandin E₂ in Chondrozyten (23, 26) und Synovialzellen (2). Prostaglandin E₂ löst beim Menschen Schmerz aus (35).

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, daß lokal applizierte Zytokine eine Erhöhung der Spontanaktivität in der Nervenwurzel begünstigen, während IL-1 Inhibitor diese Wirkung abschwächt.

Die Entstehung der Nervenwurzelspontanaktivität bzw. seine Verringerung ist im Schaubild erklärt (Fig. 2):

1. Gewisse Patienten entwickeln erhöhte Spiegel von Entzündungsmediatoren wie IL-1 in den degenerierten kleinen Wirbelgelenken und der Bandscheibe.
2. Diese Mediatoren werden lokal durch die Synovialzellen der Facetten und den Chondrozyten der Bandscheibe produziert.
3. Die Mediatoren durchqueren die Synovialmembran bzw. verlassen den Bandscheibenraum und diffundieren zur Nervenwurzel, zu den Nervenendigungen und Rezeptoren in der Nähe der kleinen Wirbelgelenke.
4. Diese Mediatoren bewirken eine Entzündung des Nerven, gefolgt von einer Funktionsverschlechterung und Destabilisierung der Nervenmembran.
5. Dieser Prozeß begünstigt die Entstehung spontaner Nervenwurzelaktivität.
6. IL-1 Inhibitoren verringern die Entstehung der Nervenwurzelspontanaktivität und der entzündlichen Nervenveränderungen durch Blockade der IL-1 Rezeptoren.

LITERATURVERZEICHNIS ZU SERIE 1

1. Adrian, E. D.: The effects of injury on mammalian nerve fibers, *Proc. roy. Soc. B*, 106 (1930) 596—618
2. Baratz ME: Synovial cell activation by Interleukin-1. M.S. Thesis. University of Pittsburgh, 1987
3. Beyer H: Handbook of tables for probability and statistics, ed 2. Cleveland, OH, Chemical Rubber Co, 1968, pp 401—408
4. Boniface RJ, Cain PR, Evans CH: Articular responses to purified cartilage proteoglycans. *Arthritis Rheum* 31: 258—266, 1988
5. Burchiel, K. J.: Spontaneous impulse generation in normal and denervated dorsal root ganglia; sensitivity to alpha-adrenergic stimulation and hypoxia. *Exp. Neurol.* 85 (1984) 257—272
6. Burchiel, K. J., Russel, L. C.: Ventral root axons exhibit spontaneous activity following peripheral nerve injury. *J. Neurosurg.* 62 (1985) 408—415
7. Claus D, Weitbrecht W, Neundörfer B: Pentobarbital. In: Schramm, Jones. *Spinal Cord Monitoring*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 90—94, 1985
8. Crock HV: Practice of spinal surgery. Springer, 1983
9. Dyson, C., Brindley, G. S.: Strength duration curves for the prediction of cutaneous pain. *Clin. Sci.*, 30 (1966) 237—241
10. Evans CH, Mazzochi RA, Nelson DD, Rubash HE: Experimental arthritis induced by intraarticular injection of allogenic cartilaginous particles into rabbit knees. *Arthritis Rheum* 27: 200—207, 1984
11. Georgescu HI, Mendelow D, Evans CH: HIG-82: An established cell line from rabbit peritarticular soft tissue, which retains the "activable" phenotype. *In Vitro* 24: 1015—1022, 1988
12. Heininger K, Fierz W, Schäfer B, Hartung HP, Wehling P, Toyka VK: Electrophysiological investigations in adoptively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis in the lewis rat. *Brain* 112: 537—552, 1989
13. Howe, JF, Loeser, J. D., Calvin, W. H.: Mechanosensitivity of dorsal root ganglia and chronically injured axons: A physiological basis for the radicular pain of nerve root compression. *Pain* 3 (1977) 25—41
14. Kelly, M.: Is pain due to pressure on nerves? Spinal tumors and the intervertebral disc. *Neurology (Minneapolis)* 6 (1956) 32—36
15. Lindblom, K., Rexed, B.: Spinal nerve injury in dorso-lateral protrusions of lumbar disks. *J. Neurosurg.* (1948) 413—432
16. Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H: IL-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neural cells of rat sciatic nerve. *Nature* 330: 658—659, 1987
17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al.: Protein measurement with folic phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265—275, 1951
18. Mac Nab I: The mechanism of spondylogenic pain in cervical pain. Carl Hirsch and Yngve Zoherman, Pergamon Press, Oxford, pp 89—95, 1971
19. McCarron, Wimpee M, Laros GS: The inflammatory effect of the nucleus pulposus: a possible element in the pathogenesis of low-back pain. *Spine* 12: 760—764, 1987
20. Melzack R, Wall PD: Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150: 971—978, 1965
21. Mixter, W. J., Barr, J. S.: Rupture of intervertebral disc with involvement of the spinal canal. *New Engl. J. Med.* 211 (1934) 210—215
22. Sall JS et al: Biochemical evidence of inflammation in discogenic lumbar radiculopathy. International Society for the Study of the Lumbar Spine, Kyoto, Japan, 1989
23. Sung K, Mendelow D, Georgescu HI, Evans CH: Characterisation of chondrocyte activation in response to Zytokines synthesized by a synovial cell line. *Biochim Biophys Acta* 971: 148—156, 1988
24. Shealy, C. N.: Percutaneous radiofrequency denervation of spinal facets. Treatment for chronic back pain and sciatica. *J. Neurosurg.* 43 (1975) 448—451
25. Wall, P. D., Devor, J.: Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. *Pain* 17 (1983) 321—339
26. Watanabe S, Georgescu HI, Mendelow D, Evans CH: Chondrocyte activation in response to factor(s) produced by a continuous line of lapine synovial fibroblasts. *Exp Cell Res* 167: 218—226, 1986
27. Wehling P, Pak MA, Cleveland, Schultz KP: The influence on spinal cord evoked potentials of chymopain applied to the rat lumbar spinal canal. *Spine* 14: 65—67, 1989
28. Wehling P, Schultz KP, Hanley EN, Pak MA: Short-term effects on SEP after lumbar intrathecal injection of collagenase in rats. *Neuro Orthop* 5: 74—77, 1988
29. Wehling P, Pak MA, Assheuer J: Frühe funktionelle

Die statistischen Berechnungen wurden gemäß dem Standard t-Test durchgeführt (2).

ERGEBNISSE

4 Stunden nach Erstinjektion wurden folgende Ergebnisse gewonnen.

Die Verlängerung der Latenz der L1 Ableitung und der CMAP Latenz durch synoviale Zytokine verglichen mit der Gruppe, die synoviale Zytokine und IL-1 Inhibitor erhielt, ist signifikant unterschiedlich (L1 Latenz-Ableitung: m: 4,01/3,66 ms, sd: 0,2/0,29, $p < 0,039$; Amplitude L1 Ableitung m: 17,33/22 μ V, sd: 6,22/6,81, $p < 0,244$; CMAP Latenz m: 8,68/7,67 ms, sd: 1,05/0,91, $p < 0,103$).

Die Ergebnisse sind in Fig. 3+4 zusammengefaßt. Die Ergebnisse zeigen, daß die Erregungsverlangsamung im gesunden Nerven, ausgelöst durch Zytokine, durch vorherige Anwendung von IL-1 Inhibitor abgeschwächt wird.

DISKUSSION

Ziel dieser Untersuchung war es, ein besseres Verständnis über die Interaktion zwischen Entzündungsmediatoren und peripherer Nervenfunktion zu erhalten.

Entzündung ist ein komplexer biologischer Ablauf, in dessen Verlauf es zur Freisetzung verschiedener humoraler Mediatoren wie Kininen, Prostaglandinen, Leukotrienen und Interleukinen kommt. Entzündungsvorgänge spielen sowohl bei Reparaturvorgängen nach Gewebsverletzungen (z. B. 9) als auch bei Gewebszerstörungen im Rahmen entzündlicher Erkrankungen (z. B. 8) eine Rolle.

In unserem Experiment wurde die Entzündung durch teilweise gereinigte Zytokinlösung der Synovialzelleinige HIG-82 ausgelöst. Wie wir in anderen Untersuchungen zeigen konnten, bewirken diese Zytokine eine erhöhte Synthese von Kollagenase, Gelatinase, Stromelysin und Prostaglandin E2 in Chondrozyten (14, 16) und Synovialzellen (1). Prostaglandin E2 löst beim Menschen Schmerz aus (23).

MacCarron et al. (12) fanden deutlich erhöhte Entzündungszeichen im Bereich der Nervenwurzeln nach Kontakt mit Nucleus Pulposus Gewebe. Dies läßt sich durch eine Interleukinaktivierung durch freie Proteoglykane erklären. Dieser pathobiochemische Mechanismus ist in anderem Zusammenhang bekannt. Boniface et al. (3) und Evans et al. (6) injizierten Proteoglykanfragmente in das Kniegelenk von Kaninchen. Nach Kontakt mit Proteoglykanen produzierten die Synovialzellen vermehrt Zytokine. Es erfolgte dann eine erhöhte Synthese von Kollagenasen und Gelatinasen durch Chondrozyten und Synovialzellen. Die Ergebnisse von McCarron lassen sich durch erhöhte Synovialzellen- und Chondrozytenaktivierung im Bereich der lumbalen Facetten erklären. Unter diesen Bedingungen bewirkt die erhöhte Chondrozytenaktivierung eine Degeneration des Knorpels der Facetten.

Die hier dargestellten Ergebnisse erklären, warum neurologische Defizite und Schmerz ohne Zeichen der Raumforderung im Bereich der Nervenwurzel entstehen können. Mit hoher Wahrscheinlichkeit werden die Zytokine in der degenerierten Bandscheibe und den Facetten produziert (15), wobei diese dann eine schädigende Wirkung auf die Nervenwurzel ausüben. Unsere Befunde könnten auch erklären, wie es bei rheumatoider

Arthritis und Arthrose zur Entwicklung von Schmerzen und zur Muskelschwäche kommen kann.

Interleukin-1 Inhibitoren führen dagegen zu einer Abschwächung dieser spezifischen Interleukineffekte und können somit als heilendes Medikament eingesetzt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Baratz ME: Synovial cell activation by Interleukin-1. M.S. Thesis. University of Pittsburgh, 1987
2. Beyer H: Handbook of tables for probability and statistics, ed 2. Cleveland, OH, Chemical Rubber Co, 1968, pp 401–408
3. Boniface RJ, Cain PR, Evans CH: Articular responses to purified cartilage proteoglycans. *Arthritis Rheum* 31: 258–266, 1988
4. Claus D, Weitbrecht W, Neundörfer B: Pentobarbital. In: Schramm, Jones. *Spinal Cord Monitoring*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 90–94, 1985
5. Crock HV: Practice of spinal surgery. Springer, 1983
6. Evans CH, Mazzochi RA, Nelson DD, Rubash HE: Experimental arthritis induced by intraarticular injection of allogenic cartilaginous particles into rabbit knees. *Arthritis Rheum* 27: 200–207, 1984
7. Georgescu HI, Mendelow D, Evans CH: HIG-82: An established cell line from rabbit periarticular soft tissue, which retains the "activable" phenotype. *In Vitro* 24: 1015–1022, 1988
8. Heininger K, Stoll G, Linington C, Toyka VK, Wekerle H: Conduction failure and conduction slowing in experimental allergic neuritis induced by P2-specific T-cell lines. *Ann Neurol* 19: 44–49, 1986
9. Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H: IL-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neural cells of rat sciatic nerve. *Nature* 330: 658–659, 1987
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al.: Protein measurement with folic phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951
11. Mac Nab I: The mechanism of spondylogenic pain in cervical pain. Carl Hirsch and Yngve Zoherman, Pergamon Press, Oxford, pp 89–95, 1971
12. McCarron, Wimpee M, Laros GS: The inflammatory effect of the nucleus pulposus: a possible element in the pathogenesis of low-back pain. *Spine* 12: 760–764, 1987
13. Melzack R, Wall PD: Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150: 971–978, 1965
14. Sung K, Mendelow D, Georgescu HI, Evans CH: Characterisation of chondrocyte activation in response to cytokines synthesized by a synovial cell line. *Biochim Biophys Acta* 971: 148–156, 1988
15. Sall JS et al: Biochemical evidence of inflammation in discogenic lumbar radiculopathy. International Society for the Study of the Lumbar Spine, Kyoto, Japan, 1989
16. Watanabe S, Georgescu HI, Mendelow D, Evans CH: Chondrocyte activation in response to factor(s) produced by a continuous line of lapine synovial fibroblasts. *Exp Cell Res* 167: 218–226, 1986
17. Wehling P, Pak MA, Cleveland, Schulitz KP: The influence on spinal cord evoked potentials of chymopapain applied to the rat lumbar spinal canal. *Spine* 14: 65–67, 1989
18. Wehling P, Schulitz KP, Hanley EN, Pak MA: Short-term effects on SEP after lumbar intrathecal injection of collagenase in rats. *Neuro Orthop* 5: 74–77, 1988
19. Wehling P, Pak MA, Assheuer J: Frühe funktionelle und strukturelle Veränderungen des Nervengewebes nach Kontakt mit Chymopapain. *Z Orthop* 126:

Fig. 1

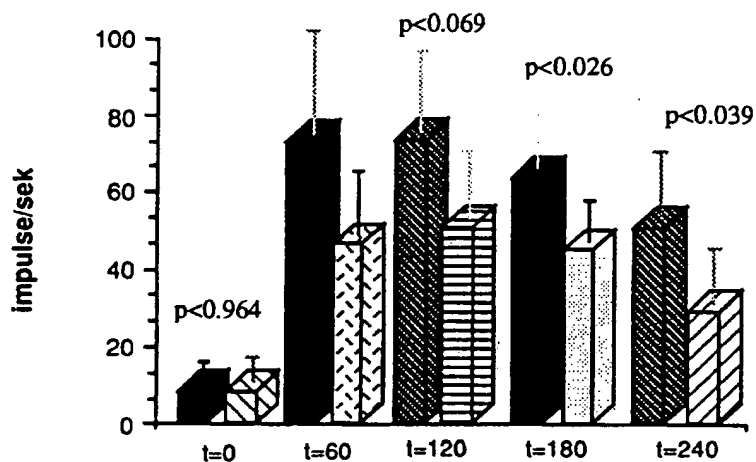


Fig. 2

